

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790979

研究課題名（和文）ヒト ES/iPS 細胞からの造血幹細胞及び機能的赤血球の誘導

研究課題名（英文）Induction of hematopoietic stem/progenitor cells and functional blood cells from human ES/iPS cells

研究代表者

丹羽 明 (NIWA AKIRA)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員

研究者番号：20546999

研究成果の概要(和文)：

ヒトの胚発生過程同様に、ES/iPS 細胞から原始線条・中胚葉系前駆細胞を段階的に誘導し、最終的に種々の血液細胞を産み出すことに成功した。サイトカインの組み合わせ次第で目的の血液細胞を効率よく誘導することができるようになり、得られた好中球や赤血球は生体の血球同様に働くことが分かった。また、中胚葉系前駆細胞を一細胞ずつ分取してその分化能を解析することで、生体と同様に血球と内皮双方への分化能を有する「ヘマンジオブラスト」が含まれることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Elucidating the in vitro differentiation of human embryonic stem (ES) and induced pluripotent stem (iPS) cells is important for understanding both normal and pathological hematopoietic development in vivo. For this purpose, a robust and simple hematopoietic differentiation system that can faithfully trace in vivo hematopoiesis is necessary. In this study, we established a novel serum-free monolayer culture that can trace the in vivo hematopoietic pathway from ES/iPS cells to functional definitive blood cells via mesodermal progenitors. Stepwise tuning of exogenous cytokine cocktails induced the hematopoietic mesodermal progenitors via primitive streak cells. These progenitors were then differentiated into various cell lineages depending on the hematopoietic cytokines present. Moreover, single cell deposition assay revealed that common bipotential hemoangiogenic progenitors were induced in our culture. Our system provides a new, robust, and simple method for investigating the mechanisms of mesodermal and hematopoietic differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：【造血発生】【中胚葉分化】【無血清培養】【再生医学】【ES/iPS細胞】

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

現在行われている造血幹細胞移植や輸血治療はしばしばドナーの負担レシピエントとの免疫学的差異が問題となる。患者由来 iPS 細胞やヒト ES/iPS 細胞のハプロタイプバンクが実現すれば有力な解決手段となりうるが、実際の臨床応用に繋げるためには、できるだけ選択的かつ安全な造血分化法の開発が肝要である。現状はほとんどの分化法が異種動物由来の血清もしくはストロマ細胞に依存している上、特に二次造血症の造血幹細胞および赤芽球への同定・分化については十分に解明されていると言えない。この点のさらなる進歩が望まれている。

2. 研究の目的

ヒト ES および iPS 細胞から無血清・異種細胞非存在下に造血幹細胞を誘導し、そこから実用可能な効率と選択性で成熟赤血球を誘導する方法を開発する。

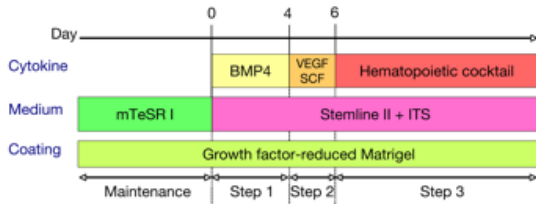
3. 研究の方法

ヒト ES/iPS 細胞コロニーをコラゲナーゼで解離し、非接着培養用に処理した培養皿で浮遊培養を行う。基礎培地としては主に臍帯血の ex vivo 増幅に用いられる無血清培地を用いる。サイトカインは主に ES/iPS 細胞の中胚葉分化に VEGF、造血分化に SCF, TPO, FL, IL3, EPO を用い、それらの濃度と投与期間を変えて検討する。

4. 研究成果

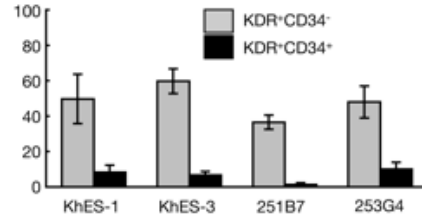
(1)

無血清培地とサイトカインのみを用い、ヒト ES / i PS 細胞から中胚葉系前駆細胞を経て各種造血細胞を効率よく分化誘導する方法を確立した。



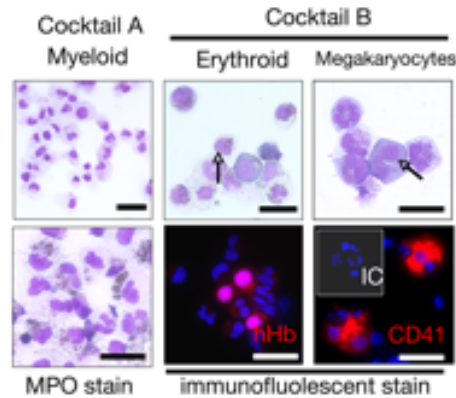
最初に、マトリゲル上の未分化な ES / i PS 細胞に対し、BMP 4, VEGF などの中胚葉誘導サイトカインを至適濃度で段階的に添加した結果、胚発生過程同様にまず原始線条、続いて中胚葉系前駆細胞（ヘマンジ

オブラスト）を順序よく誘導することに成功した。



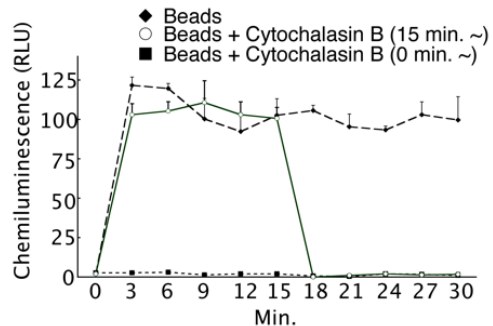
(2)

SCF, TPO, FL, EPOなどの造血サイトカインを目的に応じて組み合わせることにより、上記のヘマンジオブラストから様々な種類の血液細胞を効率よく誘導する方法を確立した。

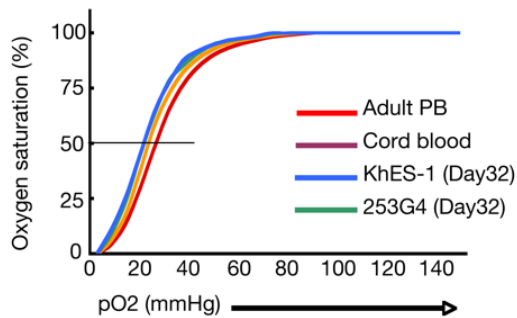


(3)

本系で得られた好中球については遊走能および貪食殺菌能を解析し、赤血球については酸素解離曲線を測定した。その結果、いずれも生体の血球同様の機能を持つことが証明された。



また、本培養系における ES / i PS 細胞由来の造血過程を赤芽球のヘモグロビン発現パターンを指標に解析したところ、興味深



いことに本系では胎仔期に一過性に見られる1次造血型から、成人で見られる2次造血型へのスイッチが経時的に起きていることがわかった。さらに、タイムラプス撮影によって、造血細胞が新たに出て移動しながら造血コロニーを形成する様子を捉えることに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1: Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ozawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, and Saito MK.

Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery.

Blood. 2012(査読あり); in press

2: Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK.

A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors.

PLoS One. 2011(査読あり);6(7):e22261

3: Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Adachi S, Suemori H, Nakahata T, Heike T.

Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells.

J Cell Physiol. 2011(査読あり);226(5):1283-91

[学会発表] (計5件)

1: 丹羽明, 平家俊男, 梅田雄嗣, 大嶋宏一, 加藤格, 末盛博文, 中畑龍俊, 斎藤潤
ヒト多能性幹細胞由来造血支持細胞を用いた、二次元無血清条件における造血分化能の定量的評価の試み

日本再生医療学会 東京 2011.3.9

2: Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T and Saito M.

In Vitro Orderly Haematopoiesis From Human Pluripotent Cells Traced In a Novel Monolayer Serum-Free Culture

American Society of Hematology, 52st Annual Meeting. 2010.12.4-7; Orlando, Florida, USA.

3: 丹羽明, 平家俊男, 梅田雄嗣, 大嶋宏一, 加藤格, 末盛博文, 中畑龍俊, 斎藤潤

ヒト多能性幹細胞を用いた、二次元無血清培養による段階的造血分化誘導

日本血液学会 横浜 2010.10.11

4: 丹羽明, 平家俊男, 梅田雄嗣, 大嶋宏一, 加藤格, 末盛博文, 中畑龍俊, 斎藤潤

ヒト ES/iPS 細胞からの in vitro 二次元無血清造血誘導における分化過程の経時的解析

炎症再生医学会 東京 2010.7.9,

5: Niwa A, Saito M, Kato I, Oshima K, Heike T, Nakahata T.

Primitive and definitive hematopoiesis of human ES and iPS cells in serum-free monolayer culture condition

ISSCR, Annual Meeting. 2010, 6.3-6; San Francisco, USA.

[図書] (計4件)

1: 丹羽明, 中畑龍俊

幹細胞の体外増幅法の現状と将来

医学のあゆみ 2012 4月号特集 医歯薬出版

2: 丹羽明

ES, iPS 細胞からの機能的赤血球産生

血液フロンティア 2009 11月号 医薬ジャーナル社

3: 丹羽明 中畑龍俊

iPS 細胞からの造血分化

Annual Review 血液 2009 中外医学社

4: 丹羽明 中畑龍俊
疾患由来 iPS 細胞の樹立
分子細胞治療 2009 メテオ MBC

6. 研究組織

(1)研究代表者

丹羽 明 (NIWA Akira)
京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員
研究者番号:20546999